

ANTIGEN AND MONOCLONAL ANTIBODY REACTIVE TO MEROZOITE OF EIMERIA SPP.**Publication number:** JP60072827**Publication date:** 1985-04-24**Inventor:** ROBAATO HARISU SHIENKERU; ROOJII
BITSKUUHARU UON; PARAIA TAMANA**Applicant:** AMERICAN CYANAMID CO**Classification:****- international:** C12N15/02; A61K39/012; A61K39/395; C07K14/005;
C07K14/195; C07K14/44; C07K14/455; C07K16/00;
C07K16/20; C12N5/10; C12P21/08; G01N33/569;
G01N33/577; A61K39/00; C12R1/91; A61K39/002;
A61K39/395; C07K14/005; C07K14/195; C07K14/435;
C07K16/00; C07K16/18; C12N5/10; C12N15/02;
C12P21/08; G01N33/569; G01N33/577; A61K39/00;
(IPC1-7): A61K39/012; A61K39/395; C12N5/00;
C12N15/00; C12P21/00; C12R1/91**- European:** C07K14/455; C07K16/20**Application number:** JP19840170519 19840817**Priority number(s):** US19830524953 19830819**Also published as:**EP0135073 (A2)
JP5284993 (A)
FI843143 (A)
ES8900150 (A)
ES8802163 (A)[more >>](#)[Report a data error](#)

Abstract not available for JP60072827

Abstract of corresponding document: EP0135073

Monoclonal antibodies against merozoites and sporozoites of *Eimeria tenella* are obtained by use of hybridoma technology. Specific antigens for use as vaccines in the prevention and treatment of coccidiosis and hybridoma cultures producing monoclonal antibodies are described.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 昭60-72827

⑫ Int.CI
A 61 K 39/395
39/012
C 12 N 15/00
C 12 P 21/00

識別記号 行内整理番号
7043-4C
7043-4C
7115-4B
7235-4B

⑬ 公開 昭和60年(1985)4月24日
※審査請求 未請求 発明の数 5 (全12頁)

⑭ 発明の名称 エイメリア種のメロゾイトに対して反応性の抗原およびモノクロナル抗体

⑮ 特願 昭59-170519
⑯ 出願 昭59(1984)8月17日

優先権主張 ⑰ 1983年8月19日 ⑱ 米国(US)⑲ 524953

⑲ 発明者 ロバート・ハリス・シエンケル アメリカ合衆国ペンシルベニア州19067ヤードレイ・ロビンフッドドライブ355

⑲ 発明者 ロージー・ピック・ハル・ウォン アメリカ合衆国ニュージャージイ州08854ピスカタウエイ・ロスホールブルバード16

⑲ 出願人 アメリカン・サイアナミド・カンパニー アメリカ合衆国ニュージャージイ州ウェイン(番地なし)

⑲ 代理人 弁理士 小田島 平吉
最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

エイメリア種のメロゾイトに対して反応性の抗原およびモノクロナル抗体

2. 特許請求の範囲

1. マウスの骨髄腫系統からの細胞およびエイメリア・テネラ (Eimeria tenella) のメロゾイトで前もって免疫化したマウスからの脾細胞の融合により形成されたハイブリドマにより生産され；

(a) エイメリア種 (Eimeria spp.) のスパロゾイトまたはメロゾイトの抗原と特異的に反応し；

(b) ほぼ15~350kDaの範囲の分子量を有するエイメリア・テネラ (Eimeria tenella) の抗原と特異的に反応する；

モノクロナル抗体。

2. P3x63.Ag8.853骨髄腫細胞お

よびエイメリア・テネラ (Eimeria tenella) のメロゾイトで前もって免疫化したマウスからの脾細胞の融合により形成されたハイブリドマにより生産された特許請求の範囲第1項記載のモノクロナル抗体。

3. クローン番号1.90で表示されかつATCC No. HB8336として受託されたハイブリドマにより生産され；クローン番号4.76で表示されたハイブリドマにより生産され；クローン番号2.03で表示されかつATCC No. HB8389として受託されたハイブリドマにより生産され；クローン番号13.90で表示されかつATCC No. HB8337として受託されたハイブリドマにより生産され；クローン番号10.08で表示されたハイブリドマにより生産され；クローン番号10.84で表示されかつATCC No. HB8387として受託されたハイブリドマにより生産され；クローン番号8.03で表示されかつATCC

No. HB 8388として受託されたハイブリドーマにより生産され；あるいはクローン番号15.84で表示されかつATCC No. HB 8335として受託されたハイブリドーマにより生産された特許請求の範囲第2項記載のモノクロナル抗体。

4. 工程：

- (a) エイメリア・テネラ (E. tene
lla) のメロゾイトでマウスを免疫化し；
- (b) 前記マウスから脾臓を取り出し、そして脾細胞の懸濁液をつくり；
- (c) 前記脾細胞をマウスの骨髄腫細胞と融合促進剤の存在下に融合させ；
- (d) 融合した細胞を、融合しない骨髄腫細胞の生長を支持しない媒質中で別々のウェル中で希釈しあつて培養し；
- (e) ハイブリドーマを含有する各ウェルの上澄みを、エイメリア・テネラ (E.
tene
lla) のメロゾイトでマウスを免疫化し；

- 3 -

8) または15.84(ATCC No. HB 8335)を適当な媒質中で培養し、そして前記ハイブリドーマの培養物の上澄みから抗体を回収することを特徴とするエイメリア種 (Eimeria spp.) のスポロゾイトまたはメロゾイトの抗原と反応するモノクロナル抗体の生産方法：あるいはマウスにNo. 1.90(ATCC No. HB 8336)、4.78、2.03(ATCC No. HB 8389)、13.90(ATCC No. 8337)、10.08、10.84(ATCC No. HB 8387)、8.03(ATCC No. HB 8388)または15.84(ATCC No. HB 8335)と表示されるハイブリドーマの培養物を注入し、そして前記抗原を前記マウスの腹水または血清から回収することを特徴とするエイメリア種 (Eimeria spp.) のスポロゾイトまたはメロゾイトの抗原と反応するモノクロナル抗体の生産方法。

- 5 -

tene
lla) のメロゾイトおよび
スポロゾイトと反応性の抗体の存在について評価し；

- (f) エイメリア・テネラ (E. tene
lla) のメロゾイトまたはスポロゾイトと反応性の抗体を生産するハイブリドーマを選択し、そしてそれをクローンングし；そして

(g) 抗体を前記クローンから回収することを特徴とする方法により生産された、エイメリア・テネラ (Eimeria tene
lla) のスポロゾイトまたはメロゾイトの抗原と反応するモノクロナル抗体。

5. ハイブリドーマのクローンNo. 1.90(ATCC No. HB 8336)、4.78、2.03(ATCC No. HB 8389)、13.90(ATCC No. 8337)、10.08、10.84(ATCC No. HB 8387)、8.03(ATCC No. HB 8388)

- 4 -

6. 特許請求の範囲第5項記載の方法の各々により生産されたモノクロナル抗体。

7. 洗浄剤含有緩衝液の存在下に可溶性であり、エイメリア・テネラ (Eimeria tene
lla) のメロゾイトの抗原として存在し、そしてほぼ300±50kdの分子量を有するハイブリドーマのクローン1.90(ATCC No. HB 8336)および4.78により分離された抗メロゾイトモノクロナル抗体と特異的に反応性であり；ほぼ130±20kdの分子量を有するハイブリドーマのクローン10.84(ATCC No. HB 8337)および15.84(ATCC No. HB 8335)により分離された抗メロゾイトモノクロナル抗体と特異的に反応性であり；あるいはほぼ18±3kdの分子量を有するハイブリドーマのクローン10.08、8.03(ATCC No. HB 8388)、2.03(ATCC No. HB 8389)および13.90(ATCC No. HB 8337)

- 6 -

により分泌された抗メロゾイトモノクロナル抗体と特異的に反応性である、抗原性、免疫原性、タンパク質性実在物。

8. 安定剤および／または製薬学的に許容される補助剤をさらに含有する特許請求の範囲第7項記載のワクチン。

9. 工程：

(a) エイメリア・テネラ (E. tenella) のスボロゾイトおよび／またはメロゾイトを抽出し、そして可溶化し；

(b) クロマトグラフィーおよび親和性カラムの方法を包含するが、これらに限定されない単離および精製の方法により、可溶化された物質を分離して、精製された抗原を得る；

ことにより調製された特許請求の範囲第7項記載の抗原ワクチン。

10. 本発明のモノクロナル抗体により同定さ

- 7 -

の寄生虫により引き起こされる動物の病気である。鳥類のコクシジウム症は、エイメリア (Eimeria) 属の種々の種により引き起こされる食用飼鳥類の破壊的な病気である。この病気は、無性および有性の両者の段階から成る複雑な生活環を有する。ニワトリは、糞便に一般に関連する自由に生きる接合子囊の摂取後に、この病気に初めて感染する。接合子囊は、ニワトリの消化管内で発育して侵入的な無性のスボロゾイトになる。スボロゾイトは上皮細胞に侵入感染し、発育してシゾント (schizonts) として知られる多核の構造体になる。各シゾントは成熟し、完璧的にメロゾイトとして知られる侵入的な無性の構造体を遊離する。これらのメロゾイトは、感染された細胞を残し、そして他の上皮細胞を再び侵す。スボロゾイトおよびメロゾイトを含む多数の侵入的な無性段階は、コクシジウム症の病理学の多くの原因となる。メロゾイトが配偶子母細胞に分化するととき、コクシジウム症の有性サイクルが

- 9 -

れた1種または2種以上の抗原に致密種を暴露することを特徴とするエイメリア種 (Eimeria spp.) の感染を防除する方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、寄生虫エイメリア・テネラ (Eimeria tenella) のメロゾイト (merozoites) およびスボロゾイト (sporozoites) に対して特異的に反応するモノクロナル (monoclonal) 抗体を得ることに関する。エイメリア・テネラ (E. tenella) に対する抗体を生産するハイブリドーマ (hybridoma) の培養物を記載する。メロゾイトの抗原を同定し、特性づける。これらの抗原は、ある種のモノクロナル抗体と一緒に、コクシジウム症 (coccidiosis) の予防および処置に有効である。本発明の抗原は、コクシジウム症に対するワクチンとして有用である。

背景として、コクシジウム症は種々の原生動物

- 8 -

開始される。配偶子合体 (fertilization) が起こり、そして接合子囊として知られる配偶子合体の生産物は糞便中に放出される。こうして、寄生虫の生活環が完結される。ニワトリにおいて、代表種のエイメリア・テネラ (Eimeria tenella) の生活環が約7～9日で完結する。

エイメリア種 (Eimeria spp.) により家畜産業へ与えられる莫大な経済的損失のため、前記寄生虫に対するワクチンは高度に望ましい。寄生虫の生活環は複雑であり、かつ各段階に存在する抗原の量は変動するため、不活性化した寄生虫または殺した寄生虫は不变の免疫性を過去において発生しないことが観察してきた。この問題の1つの解決法は、特定の抗原を寄生虫から単離し、特性づけ、そしてそれらを十分な量で投与して免疫剤として作用させることである。好ましくは、このような抗原はすべての重要な種による感染に対する保護を提供するであろう。エイ

- 10 -

メリア (*Eimeria*) の種々の種、ならびに同一種の生活環の異なる段階、は共通の抗原および特別の抗原を有することが知られている [Cerna, Z., Folia Parasitologica (Prague) 17: 135-140 (1970); Davis et al., Immunol. 34: 879-888 (1978); Rose, M. E., Immunol. 2: 112-122 (1959); Rose et al., Immunol. 5: 79-92 (1962); および Tanielian et al., Acta Parasitol. Yugosl. 7: 79-84 (1976)]。また、エイメリア (*Eimeria*) への免疫性の発現は種特異的であり、そして家禽のある種において、有意の系統特異的免疫性が存在することが知られている [Jeffers, T. K.; In Long, P. L. et al. (eds.), Avian Coccidiosis, pp. 57-

- 11 -

125, Proc. 13th Poultry Sci. Symp. (1978); Joyner, L. P., Parasitol. 69: 725-732 (1969); Long, P. L., Parasitol. 69: 337-347 (1974); および Long et al., Parasitol. 79: 451-457 (1979)]。現在、鳥類または哺乳類の宿主において防御免疫を刺激することができるエイメリア (*Eimeria*) 種の免疫原はまだ単離あるいは同定されてきていない。このようなエイメリア (*Eimeria*) の免疫原は、コクシジウム症に対して有効な免疫化を提供するように思われる。

リンパ球のハイブリドーマ技術の開発は、エイメリア (*Eimeria*) の種々の抗原に対して特異的な抗体を比較的大量に生産する道具を提供する。特異的抗体生産性細胞（脾細胞）を骨髄腫の細胞と融合することにより、もとの感作抗原に対して特異的に向けられたモノクロナル抗体を分

- 12 -

64, 932号；同第4, 384, 933号；同第4, 364, 934号；同第4, 364, 935号；同第4, 364, 936号；同第4, 381, 292号；および同第4, 381, 295号）。

動物の飼育の領域、より詳しくは食用飼鳥類の産業におけるコクシジウム症の経済的效果の前述の考察に照して、原生動物の寄生虫の抑制は高価に望ましい。したがって、本発明の目的は、寄生虫のエイメリア・テネラ (*E. tenella* 亜) のメロゾイトに対して得られた新規かつ有用なモノクロナル抗体を提供することである。他の目的は、家禽のコクシジウム症を抑制するためのワクチンとして有用なエイメリア・テネラ (*E. tenella*) の特定の抗原を単離しつつ同定することである。これらの目的は以下の説明から明らかとなり、とくに特許請求の範囲に記述されている。

エイメリア・テネラ (*Eimeria ten*

- 13 -

E. tenella) は、ニワトリの盲腸に感染する様であり、感染した動物における血液の重い病変を起こす、とくに破壊的な寄生虫である。エイメリア・テネラ (E. tenella) はその生活環において 2 つのメロゾイト段階を有し、それらの段階はそれぞれ第 1 世代および第 2 世代のメロゾイトと表示される。エイメリア・テネラ (E. tenella) に対する免疫は、その生活環の無性のメロゾイト段階の間に発現することが知られている [Long, P. (ed.), The Biology of the Coccidia, University Park Press, Baltimore, Md., (1982)].

エイメリア・テネラ (E. tenella) のメロゾイトの調製物は、後述の手順に従い、マウスを免疫化して、究極的にモノクロナル抗体を発生させるために使用される。これらのモノクロナル抗体を使用して前記寄生虫の抗原を同定す

- 15 -

べトリ皿 (plate) (Dynatech) 上へ $1400 \times g$ において 10 分間遠心して、有機体をウェルの底へ結合させた。ベトリ皿の底へ付着するスポロゾイトまたはメロゾイトを、ハイブリドーマの培養上澄み中で寄生虫またはモノクロナル抗体で免疫化したマウスの血清試料と反応させた。抗体とのインキュベーションを、 4°C において 16~18 時間あるいは室温において 2 時間実施した。結合した抗体を放射線標識第 2 抗体 187.1 [これは κ 軽鎖 (light chain) に対して特異性のラットのモノクロナル抗体である] で検出した。抗マウス κ 軽鎖抗体を、 ^{35}S -メチオニンで生物学的に標識する [Yelton, D. E., et al., Hybridoma, 1: 5-11 (1982)]。放射能を液体シンチレーションの計数により監視する。引き続いて放射線免疫アッセイを、エイメリア・テネラ (E. tenella) のスポロゾイトから得られた表面膜へ適用して、免疫マウス血清

- 17 -

る。これらのモノクロナル抗体をさらに評価して、前記寄生虫の生体内の生長を中和するそれらの能力をアッセイする。エイメリア (Eimeria) の少なくとも 1 種の種と反応し、あるいはメロゾイトまたはスポロゾイトと反応するモノクロナル抗体を引き出し、そして前記寄生虫の生長の中和を示す抗原は、防御抗原と考えられる。防御抗原は、宿食類のコクシジウム症に対するワクチンの開発のための潜在的な候補と見なされる。

次の実施例により、本発明をさらに説明する。

実施例 1

定量的放射線免疫アッセイ

抗体の量を評価するために、定量的放射線免疫アッセイを開発した。グルタルアルデヒド固定スポロゾイトまたはメロゾイト [通常 $2 \sim 5 \times 10^8$ /ウェル (well)] を 96 のウェルのポリ塩化ビニルすなわち emovawell の

- 18 -

中の抗体と膜タンパク質との反応を確保する。

実施例 2

ハイブリドーマ培養物の構成

ニワトリの腎細胞の一次培養物を、この分野で知られた手順に従って、新しく癌細胞から出現した (excreted) スポロゾイトで感染させる。感染後 5 日に培地中に放出されたメロゾイトを、 $350 \times g$ において 10 分間遠心することにより収穫する。生まれてから 18 週の雄の BALB/c マウスを、完全フロイント・アジュバント中の 1×10^7 の無傷または断片化エイメリア・テネラ (E. tenella) メロゾイトで腹腔内 (i.p.) 免疫化する。動物を、初期の免疫化後、 2×5 週の間隔で、培地 199 (Gibco) 中のメロゾイトを 2 回腹腔内注射することにより促進 (boost) する。各促進後 3 日に得られた血清を、直接免疫蛍光アッセイ (IFA) および放射線免疫アッセイ (RIA) により、エイメリア・テネラ (E. tenella) メロ

- 18 -

ゾイトに対する抗体の存在について検査する。これらのアッセイの両者は、グルタルアルデヒド固定寄生虫について実施する。

ハイブリドーマは、確立された方法に従い誘導する [Kwan *et al.* (1980), Genetic Engineering ed. by J. K. Setlow & A. Hollander, Plenum Publishing Corp., New York, pp. 31-96]。エイメリア・テネラ (*E. tenella*) メロゾイトで免疫化した2匹のマウスからの脾細胞を、30%のポリエチレンギリコール (PEG 1000, Baker Chemical) の存在下にP3骨髄腫、P3-XB3. Ag8. 653の非分認性 (non-secreting) クローンと8分間融合する。融合した細胞を96ウェルの組織培養皿 (Linbro) 中に分布させ、HAT選択培地 [Littlefield, J. W., Science, 145:

- 18 -

709-710 (1964)] 中で維持する。HAT培地は20%の胎児牛血清 (Gibco) および10%のNCTC 109 (Microbiological Associates) を含有するダルベコ (Dulbecco) の変更イーグル (Eagle) 培地中で調製する。ハイブリッド (hybrids) をインキュベーター内で37°Cおよび10%のCO₂において培養する。

培養物を、エイメリア・テネラ (*E. tenella*) メロゾイトと反応性の抗体について、IFAおよびRIA法により周期的にアッセイする。陽性の培養物を、24ウェルの組織培養皿のヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含まない培地中へ移す。ハイブリドーマをラット胚線維芽供給細胞層の上の軟質アガロース中でクローニングする [Coffins *et al.*, J. Cell Physiol., 79: 429-440 (1972)]。陽性のハイブ

- 20 -

リドーマのクローンをサブクローン (subclone) 番号で表示する (すなわち、クローン15. 84. 4は15. 84と表示するハイブリドーマのサブクローン#4である)。良好に特性づけられるサブクローンにより分離される免疫グルブリンの網および亜網を、東天二重拡散法により決定する。ハイブリドーマの洗浄剤 (NP-40) 可溶性の抽出液を、ウサギ抗マウス抗体試薬 (Maboy) と一緒に使用する。

実施例3

抗メロゾイトモノクロナル抗体の特性づけ

8種類の抗メロゾイトモノクロナル抗体の特性を表Iに示す。モノクロナル抗体の大部分は、IFAならびにRIAによると、メロゾイトならびにスポロゾイトと反応した。モノクロナル抗体1. 90および4. 76は、スポロゾイトとIFAにおいて反応せず、そしてRIAにおいて時には反応しなかった (表I中の本参照)。モノクロナル抗体15. 84はIFAにおいてメロゾイト

と反応しなかったが、RIAにおいてスポロゾイトならびにメロゾイトと等しく良好に反応した。表Iに要約したデータが示すように、抗メロゾイト融合から誘導されたモノクロナル抗体のすべてはエイメリア・テネラ (*E. tenella*) のスポロゾイトならびにメロゾイトと交差反応する。

- 21 -

- 22 -

表I

抗メロゾイトモノクロナル抗体の特性づけ

特異性

モノクロナル抗体	I F A		R I A	
	メロゾイト	スボロゾイト	メロゾイト	スボロゾイト
M 1 (1 . 9 0)	+	-	+	*
M 2 (4 . 7 6)	+	-	+	*
M 3 (2 . 0 3)	+	+	+	+
M 4 (1 3 . 9 0)	+	+	+	+
M 5 (1 0 . 0 8)	+	+	+	+
M 6 (1 0 . 8 4)	+	+	+	+
M 7 (8 . 0 3)	+	+	+	+
M 8 (1 5 . 8 4)	-	+	+	+

23

実施例4

種々のスボロゾイトに対する抗メロゾイトモノクロナル抗体の反応性

商業的に重要な5種類の球虫網 (*coccidae*) の種から誘導されたスボロゾイトに対して I F A により、モノクロナル抗体をアッセイする。これらの実験からのデータを表IIに要約する。エイメリア・テネラ (*E. tenella*) から誘導されたスボロゾイトと I F A において反応した6種類のモノクロナル抗体を使用して、種の交差反応性を研究する。結果が示すように、5種類のモノクロナル抗体はエイメリア・ネカトリックス (*E. necatrix*) およびエイメリア・マクシマ (*E. maxima*) と反応し、そして1種類のモノクロナル抗体 (15 . 8 4) は試験したすべてのエイメリア (*E. merita*) の5種と反応した。

表II

種々の種のスボロゾイトに対する抗メロゾイトモノクロナルの反応性

	エイメリア・テ ネラ (E. <u>s</u> e <i>n</i> <u>e<u>l</u><u>a</u>)</u>	エイメリア・ネ atrix (E. <u>n</u> e <i>c</i> <u>a</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>x</u>)	エイメリア・ア セルブリナ r <i>v</i> <u>u<u>l</u><u>i</u><u>n</u><u>a</u>)</u>	エイメリア・マ クシマ (E. <u>a</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>m</u> <u>a</u> <u>x</u> <u>i</u> <u>m</u>)	エイメリア・ブ ルネット (E. <u>b</u> <u>r</u> <u>u</u> <u>n</u> <u>e</u> <u>t</u>)
モノクロナル抗体			a)		
M3 (2.03)	+	+	-	+	-
M4 (13.90)	+	+	-	+	-
M5 (10.08)	+	+	-	+	-
M6 (10.84)	+	+	-	+/-	-
M7 (8.03)	+	+	-	+	-
M8 (15.84)	+	+	+	+	+

25

に保護を与える。

実施例5

生体内中和のアンセイ

モノクロナル抗体をアッセイする生体内手順を利用して、モノクロナル抗体を評価する。エイメリア・テネラ (E. se*n*ela) スボロゾイトと反応する3種類のモノクロナル抗体をこのアッセイにより評価する。3種類の異なるハイブリドーマから誘導された熱不活性化腹水症体液を用いて、新しく単離したスボロゾイトを無菌条件下でインキュベーションする。インキュベーション期間は室温において1時間である。次いで、スボロゾイトを生まれてから3週のニワトリの盲腸に外科的手術により導入する。インキュベーション後5日間、寄生虫の発育を起こさせる。この期間の終りにおいて、病変を記録して感染の程度を評価する。これらの実験の結果を、モノクロナル抗体により提供された保護%として表わし、そして表IIIに示す。これらのデータが示すように、各抗体はこの試験系のある条件下で少なくとも部分的



表III

エイメリア・テネラ (*E. teneilla*) スポロゾイトおよび
抗メロゾイトモノクロナルを使用する生体内中和アセイ

保護%

処理	動物の数	なし	部分的	完全
I. 軽い感染				
(200 スポロゾイト／動物)				
対照	1 4		6 5	3 5
M 6 (10.84)	1 3		1 5	8 5
M 8 (15.84)	1 8	5	1 7	7 8
II. 重い感染				
(1000 スポロゾイト／動物)				
対照	7	1 0 0		
M 4 (13.90)	9	8 9		1 1
M 6 (10.84)	8	7 5	2 5	
M 8 (15.84)	9	3 3	4 4	2 3
III. 重い感染				
(3000 スポロゾイト／動物)				
対照	7	1 0 0		
M 6 (10.84)	7	8 6		1 4
M 8 (15.84)	4	1 0 0		

実施例8抗原の特性づけ

モノクロナル抗体により認識されるエイメリア・テネラ (E. tenella) を、SDSポリアクリルアミドゲルの電気泳動(PAGE)により、次いでニトロセルロースのプロッティング (blotting) 手順により同定する [Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 4350-4354 (1979)].

エイメリア・テネラ (E. tenella) のスボロゾイトおよびメロゾイトを、1.5ミリモルのNH₄Cl、1.5ミリモルのMgAc₂、30 μg/mlのプロテアーゼ阻害剤のルーペプチド (Supereptin) およびアンチペイン (antipain)、4ミリモルのフッ化フェニルメチルスルホニルおよびアプロチニン (2トリプシン阻害単位/ml) を含有する 1.0ミリモルのトリス緩衝液 (pH 7.5) 中の

- 29 -

1% Nonidet P-40 (Bethesda Research Laboratory) で

溶解 (lyse) しつつ抽出する。この溶解手順は、0°Cにおける30分のインキュベーションおよび引き続く2,500×gの30分の遠心を含む。沈殿物を廃棄し、次いで、可溶化された物質をゲル電気泳動に使用する。2-メルカプトエタノールで還元した試料のSDSポリアクリルアミドゲルの電気泳動を、7~15%のポリアクリルアミドの勾配ゲル上の不連続のトリスグリシン系中で実施する。

SDS PAGE分離したタンパク質を、ニトロセルロースフィルター上に電気泳動的に45分間移す。次いで、ニトロセルロースフィルターを、腹水症の体液 (1~100倍希釈) またはハイブリドーマからの使用済みの培養液と40°Cにおいて16~18時間反応させる。正常のウサギの血清を10%の濃度ですべての抗体とのインキュベーションにおいてインキュベーションレ

- 30 -

た。結合したモノクロナル抗体は、¹²⁵I標識ウサギ抗マウスIgG抗体 (New England Nuclear) と反応させることによって検出する。第2抗体との反応は、通常室温において3~5時間である。結合しない第2抗体を洗浄により除去する。次いで、ニトロセルロースフィルターを、コダック (Kodak) X線フィルムXAR-5またはSB-5で露光する。

別法として、プロット (blot) を、BLISA法により、セイヨウワサビのペルオキシダーゼ結合ウサギ抗マウスIgG (Miles) およびクロロナフトール (Aldrich) およびBzO₂ (Baker) を基質として使用して展開する。タンパク質の抗原の分子量を分子量標準に依り決定する。

モノクロナル抗体18.84により認識された抗原を例示する。モノクロナル抗体15.84は、130±20kdの概算分子量の二重のもの (doublet) と反応する。しかしながら、

100kd程度のタンパク質の分子量の推定を、使用する分子量標準に依存して変動させて行った。130±20kd種に加えて、15.84も300±50kdの見掛け分子量を有する帶 (band) と反応する。より大きい分子量の帶は約15~20%の抗原を構成し、そして多分130±20kd種の凝集物または重合体の形態である。タンパク質抗原と反応しないことが知られているモノクロナル抗体と用いる対照実験を使用して、抗メロゾイト抗体の特異性を証明する。さらに、他の対照が証明するように、モノクロナル抗体は寄生虫特異性であり、宿主特異性のタンパク質と反応しない。

種々の抗体により認識される抗原の分子量のデータを、表IVに要約する。有益の特徴は、エイメリア・テネラ (E. tenella) メロゾイトにおいて分子量を20kdまたは>100kdの範囲の免疫原抗体の存在である。

- 31 -

- 32 -

處置

分子量のデータの要約

抗メロゾイト

<u>モノクロナル抗体</u>	<u>抗原の測定分子量</u>
M 1 (1.90)	
	300±50 kd
M 2 (4.76)	
M 6 (10.84)	
	130±20 kd
M 8 (15.84)	
M 3 (2.03)	
M 4 (13.90)	
	18±3 kd
M 5 (10.08)	
<u>M 7 (8.03)</u>	

- 33 -

収集物に加えられた。番号1.90は番号HB8336を割当てられた。番号15.84は番号HB8335を割当てられた。番号13.90は番号HB8337を割当てられた。番号10.84は番号HB8338を割当てられた。番号8.03は番号HB8338を割当てられ、そして番号2.03は番号HB8339を割当てられた。これらの抗体の利用は、特許および商標の局長により37 C. F. R. 1.14および35 U. S. C. 122に従って権利を与えること決定されたものにとって、本願の係属中において可能であり、そしてHB8333, HB8336, HB8337, HB8338, HB8339の公衆への入手可能性のすべての制限は本願へ特許が付与されたとき最終的に排除される。

番号1.90, HB8336, 15.84, HB8335, および13.90, HB8337はすべてATCCに1983年8月16日に受託さ

モノクロナル抗体15.84は中和性抗体と考えられ、そして認識された抗原は防御抗原と考えられる。さらに、15.84はエイメリア・テネラ (*E. tenella*) のメロゾイトおよびスボロゾイトならびにエイメリア・マクシマ (*E. maxima*)、エイメリア・ネカトリックス (*E. necatrix*)、エイメリア・アセルブリナ (*E. acervulina*) およびエイメリア・ブルネット (*E. brenetii*) から単離されたスボロゾイトと交差反応する。

前述の新規な抗体、1.90, 15.84, 13.90, 10.84, 8.03および2.03は、アメリカン・タイプ・カルチャーコレクション (ATCC) (the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, U.S.A. 20852) に受託され、そしてその永久的

- 34 -

れた。番号10.84, HB8387, 8.03, HB8388、および2.03, HB8389はATCCに1983年10月20日に受託された。

特許出願人 アメリカン・サイアナミド・カンパニー

代理人 弁理士 小田島 平吉



- 35 -

- 36 -

第1頁の続き

⑥Int.Cl.¹ 識別記号 厅内整理番号
// C 12 N 5/00 7115-4B
(C 12 P 21/00
C 12 R 1:91)
⑦発明者 バライア・タマナ アメリカ合衆国ニュージャージイ州07730ハズレット・ビ
レッジグリーンウェイ8